



REC'D 03 JAN 2005

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

20 OCT. 2004

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 © W / 010801

REMISE DES PIÈCES DATE 20 OCT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0312250 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 20 OCT. 2003		51 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREESE-MAJEROWICZ 3 avenue de l'Opéra 75001 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 34284/FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNi SPECIFIQUE DANS DES CELLULES ET ACIDES NUCLEIQUES POUR SA MISE EN ŒUVRE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75 171 941 PARIS Cedex 16	
	Pays	France	
Nationalité		France	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 20 OCT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0312250 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 © W / 010801
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		34284/FR	
6 MANDATAIRE <i>(s'il y a lieu)</i>		BREESE	
Nom		BREESE	
Prénom		Pierre	
Cabinet ou Société		BREESE-MAJEROWICZ	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra	
	Code postal et ville	75 001 Paris	
	Pays	France	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 77	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 78	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		office@breese.fr	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) BREESE Pierre 921038		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNi SPECIFIQUE DANS DES CELLULES ET ACIDES NUCLEIQUES POUR SA MISE EN ŒUVRE

L'invention concerne le domaine de la biologie et plus
5 particulièrement la préparation d'oligonucléotides, double brin, destinés à être
utilisés dans un processus d'interférence ARN (RNAi ou ARNi) dans le but
d'induire la dégradation d'un ARN cible.

L'interférence ARN désignée aussi « RNAi » ou encore co-
suppression, a été mise en évidence dans les plantes, où il a été observé que
10 l'introduction d'un long ARN double brin, correspondant à un gène, induit la
répression spécifique et efficace de l'expression du gène ciblé. Le mécanisme
de cette interférence comporte la dégradation de l'ARN double brin en courts
duplex d'oligonucléotides d'environ 20 à 22 nucléotides appelés siRNAs.

L'interférence ARN a maintenant été appliquée aux mammifères
15 pour inhiber spécifiquement l'expression des gènes pour des applications en
génétique fonctionnelle. En effet, les siRNAs permettent d'identifier la fonction
des gènes mis en évidence par le séquençage du génome humain, soit dans
des modèles de culture cellulaire, soit dans des modèles animaux en particulier
chez la souris. L'interférence ARN est aussi utile dans le domaine
20 thérapeutique pour le traitement ou la prévention de cancers, de maladies
infectieuses et plus généralement de maladies mettant en jeu un gène
hétérologue ou homologue muté (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W.,
Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs
mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 ;
25 Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T.
(2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in
Drosophila melanogaster embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888).

Les siRNAs sont de courtes séquences d'ARN double brin, qui
peuvent être introduites dans les cellules sous forme d'oligonucléotides
30 synthétiques ou sous forme de vecteurs permettant l'expression de ces siRNAs.
Dans cette dernière approche, le siRNA est synthétisé sous la forme d'un

précurseur qui est un shRNA (short hairpin RNA), formé d'une "tige boucle" dans laquelle la tige représente le siRNA et la boucle une séquence quelconque qui sera dégradée par les RNAases cellulaires, ce qui va donner naissance au siRNA mature.

5 La mise en œuvre de vecteurs d'expression de siRNAs présente de nombreux avantages, en particulier pour les applications de génétique fonctionnelle. Elle permet d'exprimer l'ARN double brin de manière stable dans les cellules, et donc d'inhiber plus facilement l'expression des protéines à longue demi-vie. En effet, les siRNAs synthétiques ont une durée de demi-vie
10 de 3 jours dans les cellules de mammifères. De plus, les siRNA sont dilués au cours des divisions cellulaires.

Elle permet aussi d'analyser des effets à long terme. Par contre, elle nécessite d'établir des lignées exprimant la construction de manière stable, ce qui présente plusieurs inconvénients. En particulier, il faut comparer des lignées
15 stables entre elles, ce qui est en général difficile d'interprétation parce que les lignées cellulaires dérivent. D'autre part, il est impossible d'étudier les protéines indispensables pour la cellule, puisque leur inhibition bloquera la prolifération des cellules et empêchera donc l'établissement de la lignée stable. Il est donc indispensable de pouvoir induire l'activité du siRNA. On entend par induire
20 l'activité du siRNA pouvoir bloquer et débloquent son activité à volonté. On entend par activité du siRNA sa capacité à reconnaître et à induire la dégradation de son ARN cible.

Il est décrit dans l'art antérieur un vecteur permettant l'expression stable et inductible de siRNA. Ce système est basé sur l'inhibition de la
25 transcription du précurseur du siRNA. En effet, le vecteur, dérivé du vecteur pSUPER (Brummelkamp T. R et al., www.sciencexpress.org/21_March_2002/page_1/10.1126/science.1068999), contient une séquence connue, "l'opérateur tetracycline" ("opérateur TET"), positionnée entre le promoteur dirigeant la transcription du siRNA et la séquence codant ledit siRNA. En
30 présence de la protéine "répresseur TET", celle-ci se fixe sur "l'opérateur TET" et bloque ainsi la transcription du siRNA. En présence de doxycycline, celle-ci

inhibe la fixation de la protéine "répresseur TET", sur "l'opérateur TET" et permet donc la transcription du siRNA. Ce système d'expression engendre un bruit de fond d'activité relativement élevé.

De plus, les systèmes inductibles basés sur les promoteurs fonctionnent très mal dans les vecteurs viraux, parce que les promoteurs viraux prennent le pas sur les promoteurs inductibles et le bruit de fond est très élevé.

L'invention vise précisément à palier ces inconvénients en offrant un système permettant d'induire à volonté l'activité d'un siRNA.

Ce but est atteint par la présente invention grâce à l'emploi du couple protéine TAT-séquence ARN TAR pour bloquer l'activité d'un siRNA dans des cellules de mammifères.

Le principe de l'invention est basé sur l'interaction TAT/TAR. En effet, le siRNA doit être reconnu dans la cellule par un complexe protéique, appelé complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), qui va lui faire subir une étape de maturation et l'utiliser comme guide pour reconnaître et dégrader le mRNA cible. La protéine TAT peut être utilisée pour bloquer cette dernière étape.

La protéine TAT du VIH joue un rôle crucial dans la réplication virale. En effet, en tant que facteur de transcription, TAT régule la vitesse de réplication du virus. TAT est une protéine sécrétée capable de diffuser dans les cellules non-infectées et de préparer un environnement propice à l'infection virale. La protéine TAT existe sous deux formes (71 et 101 acides aminés) codées par deux exons séparés par le gène *env*. TAT exerce sa fonction d'activateur du promoteur du VIH en se liant à la séquence d'ARN TAR présente en 5' de tous les ARN du VIH.

La liaison de TAT et de ses co-activateurs transcriptionnels cellulaires à l'ARN TAR va stimuler l'élongation de la transcription en augmentant la processivité de l'ARN polymérase II.

La présence d'ARNs double brins dans une cellule représente un signal : il met en jeu une RNase III nommée Dicer. Cette ribonucléase coupe les longs ARN double brin en petits fragments d'ARN double brin, les siRNAs, de

taille et de structure précises, en général 21 à 23 nucléotides. Les siRNAs duplexes s'associent ensuite avec des protéines pour former un complexe nommé RISC (pour « *RNA-Induced Silencing Complex* »). RISC est donc un complexe ribonucléoprotéique contenant une molécule de siRNA associée à des protéines appartenant à la famille Argonaute. RISC guide, grâce à l'extrémité 5'Phosphate d'un siRNA simple brin, les petits siRNAs pour la reconnaissance spécifique de la séquence de l'ARN messager cible et catalyse son clivage ; cette réaction a lieu dans le cytoplasme. Cela aboutit à l'inhibition de la traduction et ainsi à l'inhibition de l'expression du gène cible.

10 Selon l'invention, la boucle du précurseur du siRNA (shRNA), normalement constituée de séquence quelconque, est remplacée par une séquence nucléotidique codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT.

15 Ladite séquence référencée dans la liste de séquences soumise en annexe sous le numéro SEQ ID N° 1, est composée de 11 nucléotides et présente l'enchaînement suivant : ATCTGAGCTCT (ou AUCUGAGCUCU sous sa forme ARN).

20 Il est également possible d'utiliser selon l'invention, une séquence codant pour la totalité de la séquence TAR sauvage ou mutée ou tout fragment de celle-ci contenant ladite séquence en nucléotides, minimale non-mutée ci-dessus décrite. Cette séquence (ADN ou ARN) est dénommée par ailleurs dans le texte séquence séparatrice.

25 La séquence séparatrice utilisée selon l'invention peut être naturelle ou synthétique.

Ainsi, en présence de la protéine TAT, celle-ci interagit avec la boucle TAR sur le shRNA, et l'interaction du siRNA avec le complexe protéique de maturation (complexe RISC) ne peut se réaliser et le siRNA ne subit pas les étapes de maturation induites par ledit complexe et reste donc inactif c'est-à-dire sous la forme shRNA.

En l'absence de la protéine TAT, la boucle TAR du shRNA est

dégradée et le siRNA résultant est accessible au complexe de maturation RISC et le processus de dégradation de l'ARN cible par l'ARNi peut ainsi s'effectuer.

L'invention a donc pour objet une méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

- 5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un
 acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un
 ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant
 séparées par une séquence nucléotidique comprenant au moins
10 la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans la
 liste de séquences fournie en annexe, codant pour au moins une
 séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR,
 minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT,
 dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN,
 ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant
15 un complexe inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;
- on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

La séquence séparatrice peut être constituée par toute séquence nucléotidique pourvu qu'elle comprenne au moins la séquence SEQ ID N°1. Avantageusement la séquence séparatrice est constituée d'une séquence
20 codant pour la séquence TAR complète, sauvage ou mutée, ou d'un fragment
de celle-ci comprenant une séquence codant pour la séquence SEQ ID N°1.

Selon une forme particulière de mise en œuvre de la méthode de l'invention, ledit acide nucléique codant pour les séquences comprenant les
séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence
25 séparatrice ci-dessus décrite peut être introduite dans la cellule sous la forme
d'un vecteur d'expression, particulièrement sous la forme d'un plasmide ou d'un
vecteur viral.

Dans cette forme de réalisation, l'ARNi d'intérêt sera transcrit à partir
du vecteur codant pour le shRNA qui va donner naissance au siRNA après
30 clivage de la séquence séparatrice simple brin. Ainsi, le vecteur comprend au
moins une séquence en nucléotides codant pour les séquences sens et

antisens du siRNA séparées par une séquence nucléotidique comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1, sous la dépendance d'un promoteur de transcription.

5 Ledit acide nucléique décrit ci-dessus permet la mise en œuvre de la méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules eucaryotes.

Le vecteur peut en outre comprendre un gène de résistance à un antibiotique. Avantageusement selon l'invention, le gène de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

10 La présence d'un gène de résistance à un antibiotique, comme la néomycine, permet de sélectionner les cellules transfectées.

Selon l'invention, lorsque les cellules sont des cellules en culture, la protéine TAT peut être introduite dans lesdites cellules par simple culture des cellules dans un milieu comprenant la protéine TAT.

15 En effet, un avantage de la présente invention réside dans le fait que la protéine TAT pénètre spontanément dans les cellules lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu de culture contenant la protéine TAT. Il est donc facile de bloquer l'action du siRNA, comprenant la séquence séparatrice TAR telle que décrite précédemment, en cultivant les cellules contenant le siRNA dans un milieu de culture contenant de la protéine TAT, et de stimuler l'activité de l'ARNi en cultivant lesdites cellules dans un milieu de culture sans protéine TAT, ce qui
20 conduira à la dégradation de l'ARN cible par le l'ARNi.

Dans ces conditions le milieu de culture peut contenir la protéine TAT en une concentration comprise entre 0,1 µg/ml et 5 µg/ml préférentiellement 0,5 µg/ml et 1,5 µg/ml et très préférentiellement 1 µg/ml.

25 La protéine TAT peut aussi être introduite dans la cellule sous la forme d'un vecteur d'expression inductible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT. Dans ce cas, l'expression de la protéine pourra être induite ce qui aura comme conséquence d'inhiber l'activité de l'ARNi et donc de bloquer la dégradation de l'ARN cible par l'ARNi. La
30 dégradation de l'ARN cible par l'ARNi pourra alors être induite lorsque la

synthèse de la protéine TAT sera elle-même bloquée.

Selon l'invention, les cellules transfectées avec l'acide nucléique selon l'invention sont des cellules de mammifères. La méthode s'applique aussi bien à la transfection de cellules en culture que directement chez l'animal.

5 L'invention permet d'analyser de manière fiable les gènes, particulièrement les gènes humains d'un point de vue fonctionnel, dans des cellules en culture ou dans des animaux, en particulier dans des souris.

L'invention se rapporte encore à une cellule ou une lignée de cellules dans laquelle un acide nucléique selon l'invention, tel que décrit précédemment
10 a été introduit.

L'invention se rapporte aussi aux animaux comprenant des cellules dans lesquelles l'acide nucléique selon l'invention tel que décrit précédemment a été introduit.

L'invention a enfin pour objet des compositions, notamment
15 pharmaceutiques, comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon l'invention tel que décrit précédemment ou des cellules contenant ledit acide nucléique, telles que décrites précédemment, éventuellement associées dans la composition à un excipient compatible.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des
20 exemples qui suivent et dans lesquels il sera fait référence au dessin en annexe dans lequel la figure 1 représente l'inhibition du marqueur GFP par l'ARNi.

Exemple 1 : construction du plasmide pTATOF-siRNAGFP codant pour un ARNi dont la cible est l'ARN messager codant pour la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein : GFP) :

25 Ce plasmide est construit à partir du plasmide pSUPER, permettant l'expression constitutive de siRNA et décrit par Brummelkamp et al.

La séquence d'ADN (oligonucléotide ADN synthétique synthétisé à façon), contenant dans l'ordre les séquences SEQ ID N°2 (codant pour le siRNA sens)-SEQ ID N°1 (codant pour la séquence séparatrice)-SEQ ID N°3
30 (codant pour le siRNA anti-sens) est introduite immédiatement en aval du

promoteur H1 du plasmide pSuper aux sites Bgl II en 5', et Hind III en 3'. On obtient ainsi le vecteur d'expression pTATOF-siRNAGFP.

(SEQ ID NO. 2) codant pour le siRNA sens :
5' GCAAGCTGACCCTGAAGTTC 3'
3' CGTTCGACTGGGACTTCAAG 5'
séquence codant pour la séquence séparatrice (SEQ ID NO. 1)
5' ATCTGAGCTCT 3'
3' TAGACTCGAGA 5'
(SEQ ID NO. 3) codant pour le siRNA anti-sens :
5' GAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3'
3' CTTGAAGTCCCAGTCGAACG 5'

Ainsi, les séquences codant pour les siRNA sens et anti-sens sont séparées par une boucle TAR minimale, codée par la séquence séparatrice nommée SEQ ID NO.1, codant pour la séquence minimale reconnue par la protéine TAT (SEQ ID NO. 4).

Codant pour le SiRNA :
5' GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGAGCTCTGAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3'
CGTTCGACTGGGACTTCAAGTAGACTCGAGACTTGAAGTCCCAGTCGAACG 5'
Codant pour le SiRNA complémentaire :

Exemple 2 : inhibition de l'expression de la GFP par le siRNAGFP exprimé par le vecteur de l'exemple 1 :

Des cellules de mammifères COS-7 sont transfectées avec du polyfect (Qiagen) avec 4 µg de vecteurs d'expression des siRNA (pTATOFsiRNAGFP, partie A, ou pSuper siRNAGFP sans boucle TAR, partie B), ainsi qu'un vecteur d'expression de la Green Fluorescent Protein ou GFP (500 ng). Soixante heures après la transfection, un western blot a été réalisé à partir des extraits totaux en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP (Santa cruz) ou la tubuline cellulaire (Sigma) afin d'évaluer la quantité de protéines utilisée pour ce test.

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal en présence (wt) ou en l'absence (-) d'un vecteur

d'expression (0,5 µg) de la protéine TAT ou de ses mutants, co-transfectés (Bres V, et al. *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):754-61).

Un témoin est réalisé avec des cellules n'ayant pas reçu le vecteur d'expression des siRNA (pTATOF-siRNAGFP ou pSuper siRNAGFP), cultivées en l'absence de protéine TAT. De même des témoins sont réalisés avec un vecteur d'expression de la protéine TAT mutée (incapable de lier la séquence TAR) en présence du vecteur d'expression des siRNA (pTATOF-siRNAGFP ou pSuper siRNAGFP).

La Figure 1 montre les résultats de cette expérience :

Partie A :

En l'absence de protéine TAT et de vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est présente dans les cellules (colonne 1).

En l'absence de protéine TAT et en présence du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est dégradée (colonne 2).

En présence de protéine TAT sauvage et du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est présente dans les cellules (colonne 3) en quantité comparable à celle présente dans les cellules n'ayant pas reçu de protéine TAT ni de vecteur pTATOF-siRNAGFP (colonne 1), et n'est donc pas dégradée.

En présence de protéine TAT mutée et du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est dégradée dans les cellules (colonne 4 et 5).

Partie B :

En l'absence de protéine TAT et de vecteur pSupersiRNAGFP (sans séquence TAR), la GFP est présente dans les cellules (colonne 1).

En l'absence de protéine TAT et en présence du vecteur pSupersiRNAGFP, la GFP est dégradée (colonne 2).

En présence de protéine TAT sauvage ou mutée et du vecteur pSupersiRNAGFP, la GFP est dégradée dans les cellules (colonne 1, 4 et 5).

Ceci démontre que la protéine TAT sauvage reconnaît la séquence séparatrice intercalée entre les séquences sens et antisens de siRNA et bloque

son activité alors qu'une protéine TAT mutée, incapable de reconnaître la séquence séparatrice n'a pas d'effet sur le siRNA qui apparaît parfaitement fonctionnel.

REVENDEICATIONS

1) Méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

- 5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique (séquence séparatrice) comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans
- 10 la liste de séquence fournie en annexe, codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT, dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant un complexe
- 15 inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;
- on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprenant les séquences codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence séparatrice est introduite

20 dans la cellule sous la forme d'un vecteur.

3) Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit vecteur est un plasmide ou un vecteur viral.

4) Méthode selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est sous la dépendance d'un promoteur de

25 transcription.

5) Méthode selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique.

6) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le gène

30 de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

REVENDEICATIONS

1) Méthode d'induction, *in vitro*, de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique (séquence séparatrice) comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans la liste de séquence fournie en
10 annexe, codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT, dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant un complexe inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;

15 - on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprenant les séquences codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence séparatrice est introduite dans la cellule sous la forme d'un vecteur.

20 3) Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit vecteur est un plasmide ou un vecteur viral.

4) Méthode selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est sous la dépendance d'un promoteur de transcription.

25 5) Méthode selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique.

6) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le gène de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

30 7) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,

7) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les cellules transfectées sont des cellules de mammifères.

5 8) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes par cultures desdites cellules dans un milieu de culture contenant ladite protéine TAT.

10 9) Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en cultivant les cellules eucaryotes dans un milieu ne contenant pas de protéine TAT.

10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes en introduisant dans lesdites cellules un vecteur inducible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT.

15 11) Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en bloquant la synthèse de la protéine TAT.

12) Un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

20 13) Une cellule ou une lignée de cellules transfectées par un acide nucléique selon la revendication 12.

14) Composition notamment pharmaceutique comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon la revendication 12 ou une cellule ou lignée de cellules selon la revendication 13, éventuellement associée dans la composition à un excipient compatible.

caractérisée en ce que les cellules transfectées sont des cellules de mammifères.

5 8) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes par cultures desdites cellules dans un milieu de culture contenant ladite protéine TAT.

9) Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en cultivant les cellules eucaryotes dans un milieu ne contenant pas de protéine TAT.

10 10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes en introduisant dans lesdites cellules un vecteur inductible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT.

15 11) Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en bloquant la synthèse de la protéine TAT.

12) Un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

13) Une cellule ou une lignée de cellules transfectées par un acide nucléique selon la revendication 12.

20 14) Composition notamment pharmaceutique comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon la revendication 12 ou une cellule ou lignée de cellules selon la revendication 13, éventuellement associée dans la composition à un excipient compatible.

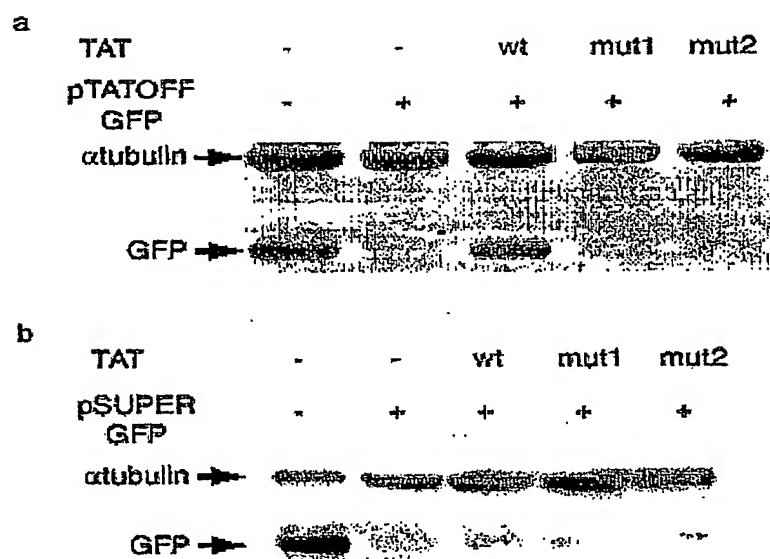


Figure 1

SEQUENCE LISTING

<110> CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

<120> Méthode d'induction d'une activité ARNi spécifique dans des cellules et acides nucléiques pour sa mise en oeuvre

<130> 34284/FR

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> séquence codant pour la séquence TAR minimale reconnue par la protéine TAT

<400> 1

atctgagctc t

11

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> séquence codant pour le siRNA antisens de la GFP

<400> 2

gcaagctgac cctgaagttc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> séquence codant pour le siRNA sens de la GFP

<400> 3

gaacttcagg gtcagcttgc

20

<210> 4

<211> 51

<212> DNA
<213> unidentified

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(51)
<223> séquence du shRNAGFP

<400> 4
gcaagctgac cctgaagtto atctgagctc tgaacttcag ggtcagcttg c

51

reçue le 19/03/04



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 0 W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		34284/FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0312250
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNI SPECIFIQUE DANS DES CELLULES ET ACIDES NUCLEIQUES POUR SA MISE EN ŒUVRE		
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS 3 rue Michel-Ange F-75794 PARIS Cedex 16 France		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		HAREL-BELLAN
Prénoms		Annick
Adresse	Rue	50 Boulevard Saint-Germain
	Code postal et ville	75005 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		AIT-SI-ALI
Prénoms		Slimane
Adresse	Rue	36 rue de la Chapelle
	Code postal et ville	91410 VILLEJUIF
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		BENKIRANE
Prénoms		Monsef
Adresse	Rue	2 rue Cap de Vie
	Code postal et ville	30120 QUISSAC
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le, 18 Mars 2004 BREESE Pierre 921038		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.